

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-292595

(43)公開日 平成 6 年(1994)10月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/06		8214-4B		
A 2 3 J 3/04		7236-4B		
	3/34	7236-4B		
C 0 7 K 15/08		8318-4H		
// A 6 1 K 7/00	J	9051-4C		

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-78343	(71)出願人	592241157 平林 潔 東京都小平市小川東町 1-16-21
(22)出願日	平成 5 年(1993) 4 月 5 日	(71)出願人	593066003 宮川 芳人 兵庫県神戸市灘区篠原北町 3 丁目 3 番 7 号
		(71)出願人	593066014 楠山 貢 東京都小金井市緑町 5 丁目13番30号
		(71)出願人	593148930 株式会社ミクロシルク 東京都港区東新橋 2-5-14
		(74)代理人	弁理士 小宮 良雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 低分子量フィブロインの製造方法

(57)【要約】

【目的】 蚕糸より得られる高分子量フィブロインを加水分解して、より機能性の高い有用なペプチドを持った低分子量フィブロインを得る。

【構成】 今まで使用されることがない加水分解酵素を使うことによって、蚕糸より得られる高分子量フィブロインを分解して、平均分子量200～4000という生理活性の高い低分子量フィブロインを得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 中性塩を含む水溶液に高分子量フィブロインを溶解し、蛋白質分解酵素を共存させ、平均分子量が200～4000のポリペプチドを生成させることを特徴とする低分子量フィブロインの製造方法。

【請求項2】 前記蛋白質分解酵素がアクチナーゼ、エラスターゼ、キモトリプシン、サモアーゼ、バンクレアチン、ペプシン、トリプシン、レニン、カテプシン、およびロクターゼから選ばれる少なくとも1種類の酵素であることを特徴とする請求項1に記載の低分子量フィブ

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、例えば食用、医薬用、医療用品、化粧品に使用できる低分子量フィブロインの製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】蚕糸は、フィブリル化結晶領域のフィブロインの周辺にセリシンが付着した構造であり、精練等の2次加工でセリシンが除去されて絹繊維として衣料に使用される。これ以外の用途においてもその優れた性質が利用されている。膜、粉末、ゲル、水溶液などいろいろな形状にでき、食用、医薬用、医療用品、化粧品に使用する用途が注目されている。

【0003】フィブロインは数十種類のアミノ酸を含んだ天然蛋白質からなるため、このようにいろいろな分野に利用できる。構成アミノ酸のうち45%を占めるグリシンおよび12%を占めるセリンには血中コレステロール濃度を抑制する作用があり、第2位のアラニンはアルコール代謝を促進し、またチロシンには痴呆症の予防効果があるとされている。またインスリンの分泌を促進するとも言われている。このような機能性食品には、高濃度の塩化カルシウム溶液に蚕糸を溶解し透析することで得られる再生フィブロイン溶液のシルクドリンク、これをゲル化したゼリー、フィルム状にしたペーパー食品などがある。このようなフィブロインの食品は、例えば特開平1-256350号公報に開示されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】同公報に開示されているフィブロインは、蚕糸に含まれるフィブロインを溶解し精製したものであり分子量が30万以上の蛋白質であり、そのままの状態では人体で消化吸収されにくい。このためフィブロインの分子鎖を断ち切ることで、低分子化することが好ましい。また低分子化することで水に対する溶解度が高まるので利用範囲が広がる可能性もある。

【0005】そこで発明者は、塩酸による加水分解でフィブロインの分子鎖を断ち切り、低分子化することを試みた。しかしながら塩酸による加水分解は、分子鎖をランダムに切ってしまうので、加水分解物の分子量の制

御は困難であった。得られた低分子量フィブロインは、分子量が150以下のアミノ酸レベルにまで分解されていたものもかなり含んでいた。この低分子量フィブロインを粉末にしたものは、黄色に着色しており、異臭や独特な味がするものであった。この低分子量フィブロイン粉末を水に再溶解させようとすると、かなりの未溶解残渣が残った。このような不純物を除くため、活性炭により処理することを試みた。得られたものの性能は良かったが、収率が50%以下と悪いものとなった。

【0006】上記したように従来の方法で製造された低分子量フィブロインは、分子量が適正なものになりにくく不純物を多く含み、また不純物を除去するための工程を付加すると製造工程が煩雑になるだけでなく、収率が悪いものになってしまう。本発明はこのような欠点を排除し、分子量が適度にコントロールされた純粋な低分子量フィブロインを、収率良く製造するための製造方法を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため、発明者は蛋白質加水分解酵素（プロテアーゼ）がフィブロインの分子鎖にある特定の箇所を断ち切ることに着目し本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明の低分子量フィブロインの製造方法は、中性塩を含む水溶液に高分子量フィブロインを溶解し、タンパク質分解酵素を共存させ、平均分子量が200～4000のポリペプチドを生成させるものである。

【0009】蛋白質分解酵素はアクチナーゼ、エラスターゼ、キモトリプシン、サモアーゼ、バンクレアチン、ペプシン、トリプシン、レニン、カテプシン、およびロクターゼの中から選んで使用することができる。なかでもアクチナーゼ、エラスターゼは平均分子量が200～4000のポリペプチドを生成させるのに好ましい。特にアクチナーゼを使用して得られた低分子量フィブロインは、ペプチドの数が3から5程度、平均分子量が200～500程度と人の食用に適し、生理活性にも優れているものとなっている。

【0010】高分子量フィブロインを溶解させるための水溶液に含まれる中性塩は、塩化カルシウム、もしくは臭化リチウムである。またこの中性塩を含む水溶液にエタノールを混合させておいてもよい。

【0011】

【作用】高分子量フィブロインをタンパク質分解酵素で加水分解するため、分子量が適度な値、200～4000にコントロールされた純度の良いポリペプチドが収率良く生成する。

【0012】

【実施例】蚕糸から低分子量フィブロインの粉末を得るには、以下のとおりの工程を経る。まず蚕糸原料、例えば屑繭を炭酸ナトリウムの0.5%溶液に浸漬し、加

熱、攪拌することでセリシンが除去され、フィブロインの繊維が得られる。このフィブロインの繊維を中性塩の水溶液である塩酸カルシウムに入れ、煮沸すると溶解する。この溶解液を透析するとフィブロイン溶液が得られる。このフィブロイン溶液に加水分解酵素、例えばエラスターゼをフィブロインの1500量に対して1量程度加える。温度は37℃程度に保つ。加水分解酵素の活性に適したpHを保つため緩衝液を入れておく。加水分解酵素がエラスターゼの場合、適正なpHは8.8であり、緩衝液として0.05Mトリス〔トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン〕を使用できる。

【0013】酵素加水分解後は速やかに煮沸し酵素を失活させ、遠心分離により反応液を上澄液と沈殿に分ける。上澄み液と沈殿をそれぞれ約5日間ほど凍結した後、凍結乾燥機で乾燥し、粉末試料として低分子量フィブロインを得る。上澄液から得た粉末重量S、沈殿から得られた粉末重量Pから下記の式で収率を計算できる。 $\{S/(S+P)\} \times 100 = \text{収率}(\%)$

得られた低分子量フィブロインの特性は、電気泳動、赤外吸収スペクトル、熱重量分析(TGA)、電子顕微鏡写真撮影、ゲル濾過、アミノ酸分析により調べることができる。以下、本発明を適用する方法で低分子量フィブロインを製造した実験例、およびその実験例で製造された低分子量フィブロインの特性評価について記載する。

【0014】フィブロイン溶液の作製

蚕糸の原料である繭は、東京農工大付属津久井農場産の家蚕である朝日東海を用いた。この家蚕繭を沸騰した50倍量の0.5重量%炭酸ナトリウム水溶液で30分間2回精練してセリシンを除去した。得られたフィブロインは水洗した後乾燥させた。精練したフィブロインを、20倍量の40~50%塩化カルシウム水溶液中で煮沸し溶解した。これを室温で十分冷却し、水中でセルロースチューブに入れて3日間透析した後、風乾により濃縮した。フィブロイン溶液の濃度は乾燥重量法により測定した。得られたフィブロイン溶液を2重量%濃度に調整し、加水分解に供した。

【0015】実施例1：エラスターゼによる加水分解

2重量%フィブロイン溶液の有効フィブロイン1500*

表 1

分解時間	水溶性粉末の収率(%)	非水溶性粉末の収率(%)
12時間	94.8	5.2
24時間	96.6	3.4
48時間	98.7	1.3

【0020】この表1より加水分解が進むにつれ、沈殿物の比率が少なくなっていることが分かる。所定時間の※50

*重量に対し、エラスターゼを1重量の割合で溶解し、緩衝液0.05Mトリス〔トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン〕を入れてpHを8.8、温度を37℃に保ち所定の時間(12~48時間)反応させた。所定の時間後、速やかにフィブロイン溶液を煮沸し、酵素を失活させ、遠心分離により反応液を上澄液と沈殿に分けた。上澄液と沈殿をそれぞれ約5日間ほど凍結した後、凍結乾燥機(東京理化工機製 FREEZEDRYER FDU-830)で乾燥し、低分子量化したフィブロインを得た。上澄液から得られた粉末を水溶性粉末、沈殿から得られた粉末を沈殿物とし、特性評価試料とした。

【0016】最適酵素濃度について確認するために、前記のエラスターゼ量：有効フィブロイン量=1:1500の他に、エラスターゼ量：有効フィブロイン量=1:3000、エラスターゼ量：有効フィブロイン量=1:6000の酵素濃度についても加水分解し、溶液の清澄度を比較した。その結果、酵素量の多いものがより清澄度が高かった。つまりエラスターゼ量：有効フィブロイン量=1:1500が最適酵素濃度である。

【0017】このことを確認するためにも上記の3種類の試料溶液につき、電気泳動試験をおこなった。溶液濃度を5mg/mlになるように調整したフィブロイン溶液10μlを15%均一の濃度勾配SDSポリアクリルアミドゲルに塗付した。泳動用緩衝液を用いて20mAの低電流で約2時間泳動した。泳動終了後、ゲルはを色液に2時間、脱色液に12時間浸した。電気泳動によってもエラスターゼ量：有効フィブロイン量=1:1500が最も分解度が高いことがわかった。

【0018】エラスターゼによる加水分解反応の時間的推移を調べるため、加水分解時間が12時間、24時間、48時間における収率を調べた。尚、試料は、酵素濃度がエラスターゼ量：有効フィブロイン量=1:1500についてのものである。表1には加水分解時間による得られた低分子量フィブロインの水溶性粉末の収率を示してある。

【0019】

【表1】

5

0%以上と高い収率を占めた。

【0021】次に加水分解の終点を知るため、pH変動値測定をおこなった。アルカリ側で加水分解する場合、アミノ基はこのpHではほとんど解離しない。遊離カルボキシル基のみが解離するので、溶液のpHが次第に下がることを利用し、加水分解の終点を知ることができる。測定においてはフィブロン溶液濃度を2%に調整し、酵素量を次のように調整した。

(1) エラスターゼ量：有効フィブロン量=1：1500

(2) エラスターゼ量：有効フィブロン量=1：3000

(3) エラスターゼ量：有効フィブロン量=1：4500

(4) エラスターゼ量：有効フィブロン量=1：6000

4N NaOHを一定時間ごとに添加することによって、加水分解によって微変動したpHを反応前のpH=8.8に戻し、その後のpH変動をガラス電極式水素イオン濃度計を用いて測定した。その結果を図1に示す。図1よりpH変動値の挙動は酵素量が異なっても変わらず、急激なpHの変動を示した後、2時間～6時間ではほぼ一定の変動を示した。その後グラフは上下している。この上下運動を繰り返しながら、振幅が小さくなり終点に向かっていくと考えられる。

【0022】さらに酵素濃度がエラスターゼ量：有効フィブロン量=1：1500で得られた低分子量フィブロンに、電気泳動をおこない、各時間における加水分解度を調べた。評価試料は加水分解時間1分～48時間のものを使用した。これによると加水分解時間12時間までは分解が進んでいく様子が観察できるが、12時間以降の分解度の違いは分からなかった。

【0023】以降、評価試料は加水分解時間48時間、エラスターゼ量：有効フィブロン量=1：1500の酵素量で得られた低分子量フィブロンの水溶性粉末および沈殿物を使用する。

【0024】先ず最初に、赤外吸収スペクトル分析をおこなった。赤外分光光度計は島津製作所製IR-435を用い、KBR法により測定した。波長領域は400～4000 cm^{-1} とし、サンプルは48時間の低分子量フィブロンを用いた。この結果を図2に示した。水溶性粉末は1648 cm^{-1} 、1534 cm^{-1} 、1248 cm^{-1} に吸収が見られた。これはランダムコイルのアミドI、アミドII、アミドIIIの吸収に一致する。また沈殿物には1620 cm^{-1} 、1530 cm^{-1} 、1230 cm^{-1} に吸収が見られた。これはアミドI、アミドII、アミドIIIの β 構造に一致する。

【0025】次に熱重量分析をおこなった。熱分析装置は島津製作所製DTA-30を用いて試料の熱分解温度を測定した。測定条件は空气中で、昇温速度10 $^{\circ}\text{C}/\text{m}$

6

in、温度範囲30～600 $^{\circ}\text{C}$ とした。第2次分解温度は絹の分解の始まる温度(約290 $^{\circ}\text{C}$)であり、この温度で微結晶は破壊される。水溶性粉末ではその温度が約220 $^{\circ}\text{C}$ であり、この温度は時間が経過してもほとんど変わらなかった。第3次分解温度は時間が経過していくにつれ低温側にシフトした。

【0026】次に凍結乾燥した際に緩衝液から生じる粉末を除去していないので、この粉末がどのような状態で水溶性粉末および沈殿物に存在するか、また水溶性粉末および沈殿物の表面状態がどのようなものか観察するため電子顕微鏡写真を撮影した。上澄液、沈殿から得た粉末、および0.05M トリス[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]緩衝液のみを凍結乾燥して、得られた粉末の電子顕微鏡写真を撮影した。水溶性粉末、および沈殿物のどちらにも緩衝液から生じた粉末は見当たらなかった。また両者を比較すると水溶性粉末の表面は滑らかだが、沈殿物には凹凸が見られた。

【0027】次に水溶性粉末の分子量分布を詳しく調べるために、ゲル透過をおこなった。ゲルにはセファデックスG-50を用い、蒸留水で膨潤させた後、ガラス管に充填した。移動相には脱気した蒸留水を用い、流速10～20 $\text{m} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ で低分子量フィブロンの分離をおこない、分光光度計で210nmの吸光度を測定した。図3にその結果を示す。これより時間の経過とともに高分子量のものが、低分子量のものへと加水分解していくことがわかる。

【0028】次に水溶性、疎水性に対するアミノ酸組成の影響を見るためアミノ酸分析をおこなった。水溶性粉末および沈殿物に200倍量の6N塩酸を加え、減圧風管した後、110 $^{\circ}\text{C}$ で24時間加熱した。加熱終了後、塩酸をロータリーエバポレーターで除き、試料を1000倍のクエン酸ナトリウム緩衝液(pH=2.2)で薄めた後、自動アミノ酸分析装置でアミノ酸組成を調べた。この結果、アミノ酸組成には両者の間に差が見られなかった。

【0029】実施例2：アクチナーゼによる加水分解2重量%フィブロン溶液の有効フィブロン10重量%に対し、アクチナーゼを1重量%の割合で溶解し、緩衝液0.05Mトリス[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]を入れてpHを7.0、温度を37 $^{\circ}\text{C}$ に保ち、所定時間(1～24時間)反応させた。所定時間後、速やかにフィブロン溶液を煮沸し、酵素を失活させ、遠心分離により反応液を上澄液と沈殿に分けた。上澄液と沈殿をそれぞれ約5日間ほど凍結した後、凍結乾燥機(東京理化器械製 FREEZE DRYERFDU-830)で乾燥し、低分子量化したフィブロンを得た。上澄液から得られた粉末を水溶性粉末、沈殿から得られた粉末を沈殿物とし、特性評価試料とした。

【0030】最適酵素濃度について確認するために、前記のアクチナーゼ量：有効フィブロン量=1：10、

アクチナーゼ量：有効フィブロイン量＝1：20、アクチナーゼ量：有効フィブロイン量＝1：100の酵素濃度についても加水分解し、溶液の清澄度を比較した。その結果、酵素量の多いものがより清澄度が高かった。つまりアクチナーゼ量：有効フィブロイン量＝1：10が最適酵素濃度である。

【0031】以降、アクチナーゼによる加水分解で生じた低分子量フィブロインの評価には、アクチナーゼ量：有効フィブロイン量＝1：10で得られた試料を用い *

*た。

【0032】アクチナーゼによる加水分解反応の時間的推移を調べるため、加水分解時間が1時間、4時間、8時間、12時間、24時間における収率を調べた。表2には加水分解時間により得られた低分子量フィブロインの水溶性粉末の収率を示してある。

【0033】

【表2】

表 2

分解時間	水溶性粉末の収率 (%)	非水溶性粉末の収率 (%)
1 時間	96.0	4.0
4 時間	93.6	6.4
8 時間	92.0	8.0
12 時間	90.4	9.6
24 時間	90.3	9.7

【0034】表2に示すようにすべての分解時間において水溶性粉末の収率が90%以上という高い値を示している。

【0035】この分解時間12時間の水溶性粉末でゲル濾過をおこなった。ここでのゲルはセファデックスG-15を使用した。他の条件はエラスターゼによる加水分解と同じである。ゲル濾過の結果を図4に示した。図4より1時間では高分子量と低分子量のピークがブロード気味に出ている。時間が経過していくにつれ高分子量、低分子量のピークとも鋭くなり低分子量側にシフトした。このフィブロインの分子量は、高分子量側のものは約550、低分子量側のものは約220であった。このフィブロインは、ペプチド結合を3～5含んだ低重合体である。フィブロインはペプチド結合が多過ぎて、分子量が大きくなり過ぎると消化吸収が困難になる。またペ※

※ブチド結合が少なすぎて、塩酸加水分解で得られるような分子量150以下のものだと、機能的に劣ったフィブロインになってしまう。したがってここで得られた分子量220～550のフィブロインは機能的に最も優れた低分子量フィブロインである。

【0036】アクチナーゼによる加水分解で得られた低分子量フィブロインのアミノ酸分析を行った。尚、分析の条件はエラスターゼによる加水分解の場合と同様である。

【0037】表3にはアクチナーゼによる加水分解を1時間行なった後に得られた水溶性粉末の分析結果を示してある。

【0038】

【表3】

表 3

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 (mol%)	含有量 (μg)	含有比率 (wt%)
ASP	1.565	1.95	0.208	2.72
THR	0.787	0.98	0.094	1.22
SER	8.080	10.06	0.849	11.07
GLU	1.549	1.93	0.228	2.97
GLY	32.511	40.47	2.441	31.82
ALA	25.769	32.08	2.296	29.93
CYS	0.000	0.00	0.000	0.00
VAL	2.128	2.65	0.249	3.25
MET	0.575	0.72	0.086	1.12
ILE	0.898	1.12	0.118	1.54
LEU	0.712	0.89	0.093	1.22
TYR	3.764	4.69	0.682	8.89
PHE	0.853	1.06	0.141	1.84
HIS	0.335	0.42	0.049	0.64
LYS	0.260	0.32	0.040	0.53
ARG	0.549	0.68	0.096	1.25

【0039】表4にはアクチナーゼによる加水分解を1時間行なった後に得られた沈殿物の分析結果を示してある。
* 【0040】

【表4】

*
表 4

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 (mol%)	含有量 (μg)	含有比率 (wt%)
ASP	0.522	0.58	0.070	0.86
THR	0.317	0.35	0.038	0.47
SER	13.889	15.37	1.460	18.15
GLU	0.000	0.00	0.000	0.00
GLY	40.244	44.52	3.021	37.57
ALA	30.778	34.05	2.742	34.10
CYS	0.000	0.00	0.000	0.00
VAL	0.674	0.75	0.079	0.98
MET	0.641	0.71	0.096	1.19
ILE	0.489	0.54	0.064	0.80
LEU	0.503	0.56	0.066	0.82
TYR	1.174	1.30	0.213	2.64
PHE	0.279	0.31	0.046	0.57
HIS	0.063	0.07	0.009	0.12
LYS	0.140	0.16	0.022	0.27
ARG	0.673	0.74	0.117	1.46

【0041】表5にはアクチナーゼによる加水分解を2時間行なった後に得られた水溶性粉末の分析結果を示してある。
※ 【0042】

【表5】

※

表 5

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 (mol%)	含有量 (μg)	含有比率 (wt%)
ASP	1.559	1.92	0.208	2.76
THR	0.815	1.00	0.097	1.29
SER	9.131	11.24	0.960	12.75
GLU	1.457	1.79	0.214	2.85
GLY	33.580	41.33	2.521	33.49
ALA	27.187	33.46	2.422	32.18
CYS	0.000	0.00	0.000	0.00
VAL	2.078	2.56	0.243	3.23
MET	0.450	0.55	0.067	0.89
ILE	0.895	1.10	0.117	1.56
LEU	0.601	0.74	0.079	1.05
TYR	1.122	1.38	0.203	2.70
PHE	0.663	0.82	0.110	1.46
HIS	0.142	0.17	0.021	0.28
LYS	0.416	0.51	0.065	0.86
ARG	1.151	1.42	0.200	2.66

【0043】表6にはアクチナーゼによる加水分解を1 * 【0044】
2時間行なった後に得られた沈殿物の分析結果を示して 【表6】
ある。

*
表 6

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 (mol%)	含有量 (μg)	含有比率 (wt%)
ASP	0.201	0.28	0.027	0.28
THR	0.114	0.16	0.014	0.14
SER	4.079	5.78	0.429	4.51
GLU	0.051	0.07	0.008	0.08
GLY	12.084	17.13	0.907	9.55
ALA	16.894	23.95	1.505	15.84
CYS	0.000	0.00	0.000	0.00
VAL	0.208	0.30	0.024	0.26
MET	0.655	0.93	0.098	1.03
ILE	0.389	0.55	0.051	0.54
LEU	0.276	0.39	0.036	0.38
TYR	32.843	46.56	5.951	62.65
PHE	1.134	1.61	0.187	1.97
HIS	0.376	0.53	0.055	0.58
LYS	0.338	0.48	0.052	0.55
ARG	0.893	1.27	0.156	1.64

【0045】表3、表4に見られるように、加水分解時間1時間の水溶性粉末、沈殿物のアミノ酸組成にはそれほど大きな差は見られなかった。だが表5、表6に見られるように、加水分解時間12時間の水溶性粉末、沈殿物の組成を比較すると沈殿物のほうに疎水性アミノ酸であるチロシンが約50mol%も含まれており、親水性アミノ酸であるセリンの割合は低下している。つまり加水分解が進んでいるにもかかわらず、沈殿物の重量が増加する。これは加水分解初期段階では絹の結晶領域を構成しているアミノ酸であるグリシン、アラニン、セリンが沈殿物に多く存在し、非結晶領域を構成しているアミノ酸であるチロシン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンが水溶性の部分に多く含まれている。加水分解が終点に近づく、それまで水に溶けていた高分子量のペプチドへの加水分解も始まり、チロシンを含んだ部分は沈殿するが、逆にグリシン、アラニン、セリンを含んだペプチドは加水分解によって水溶性になっていくも※50

※のと推察される。

【0046】次に酵素の自己分解による影響を検討するために、アクチナーゼ自身のアミノ酸分析をおこなった。これによるとアクチナーゼにはアスパラギン酸が最も多く含まれていた。しかし低分子量フィブリンにおけるアスパラギン酸の含有比率(mol%)は大変低い。これより酵素量の影響は無視できるものと考えた。

【0047】次に酵素濃度に対する影響を見るため、酵素の添加量を変えて加水分解をおこない、それぞれのフィブリン溶液の清澄度を比較した。酵素量は1重量%、5重量%、10重量%の3種類でおこなった。その結果、酵素濃度が10重量%の溶液の清澄度が最も高くなった。

【0048】更に、上記と同じ3種類のフィブリン溶液から低分子量フィブリンを得て、水溶性粉末のゲル浮過をおこなった。その結果を図5に示す。酵素量1重量%では高分子量と低分子量のピークがブロード気味に

13

なった。5重量%と10重量%とを比較すると10重量%のほうがより低分子量側にシフトし、ピークも鋭く変化している。これらのことから最適酵素濃度は10重量%とした。

【0049】実施例3：水溶性の評価

最後に低分子量フィブロインの水溶性を評価した。2%フィブロイン溶液をそのまま凍結乾燥して得た試料と、*

表 7

	0.5 %	1 %	2 %	5 %	10 %
エラスターゼによる加水分解で得られた低分子量フィブロイン (48 時間)	○	○	○	△	×
アクチナーゼによる加水分解で得られた低分子量フィブロイン (12 時間)	○	○	○	○	△

○：可溶 ○：やや可溶 △：難溶 ×：不溶

【0051】エラスターゼによる加水分解で得られた低分子量フィブロインは2%までは溶解できるが、それ以上の濃度になると溶解しにくくなる。アクチナーゼ加水分解による低分子量フィブロインは5%までは溶解可能であった。この差は分子量の大きさの違いによるものと思われる。

【0052】

【発明の効果】以上、詳細に説明したように、蚕糸より得られる高分子量フィブロインの加水分解においてエラスターゼ、アクチナーゼを加水分解酵素に使用することで、従来知られていた塩酸加水分解で得られていたフィ
30 プロインよりも、高機能であり、分子量200～4000を示す低分子量フィブロインを得ることができる。 ※

14

*エラスターゼ、アクチナーゼの加水分解から得られた低分子量フィブロインを水2mlに加えておこなった。水に対する濃度は0.5%、1%、2%、5%、10%で実施した。その結果を表7に示す。

【0050】

【表7】

20※【図面の簡単な説明】

【図1】本発明を適用するエラスターゼによる加水分解のpH変動値を示す図である。

【図2】本発明を適用するエラスターゼによる加水分解で得られた低分子量フィブロインの赤外吸収スペクトルを示す図である。

【図3】本発明を適用するエラスターゼによる加水分解で得られた水溶性粉末のゲル濾過を示す図である。

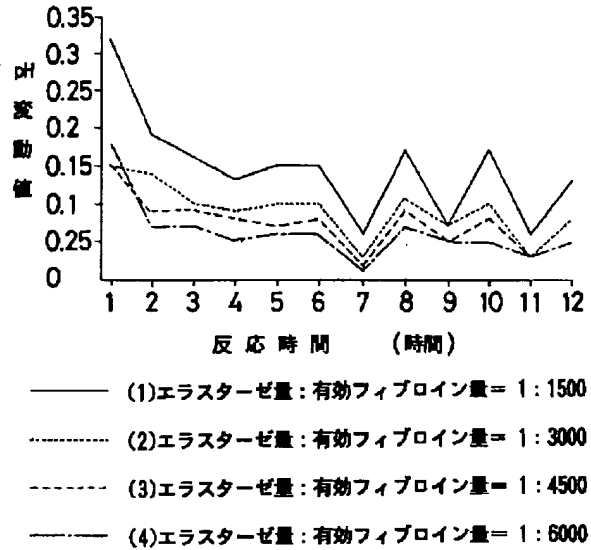
【図4】本発明を適用するアクチナーゼによる加水分解で得られた水溶性粉末のゲル濾過を示す図である。

30 【図5】本発明を適用するアクチナーゼの量の変化に対する水溶性粉末のゲル濾過を示す図である。

【図1】

図 1

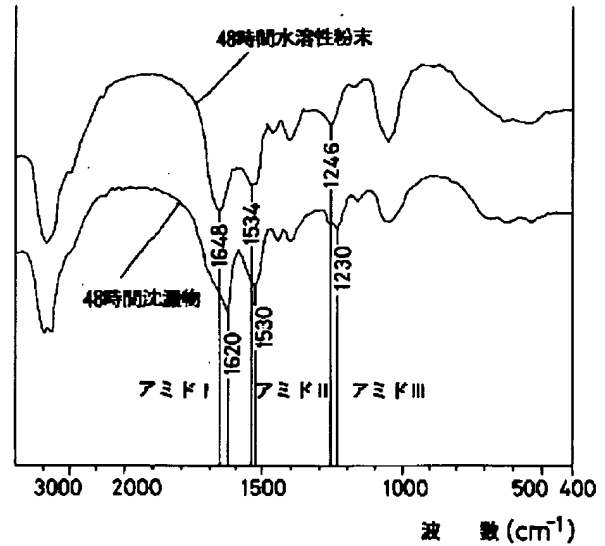
エラスターゼによる加水分解の pH 変動値測定



【図2】

図 2

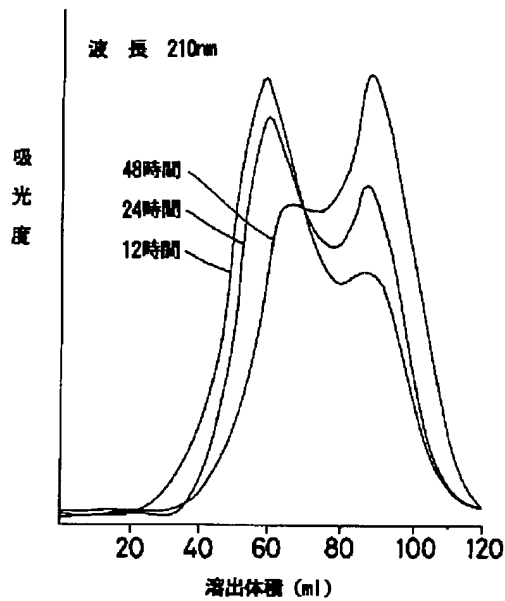
エラスターゼによる加水分解で得られた低分子
フィブリンの赤外吸収スペクトル



【図3】

図 3

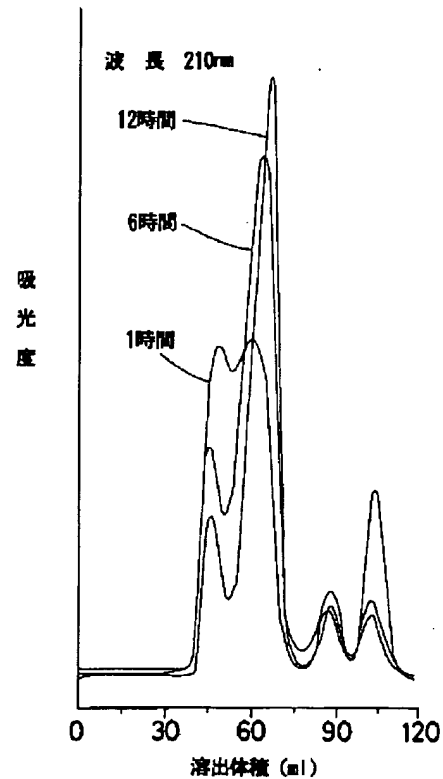
エラスターゼによる加水分解で得られた水溶性粉末のゲル濾過



【図4】

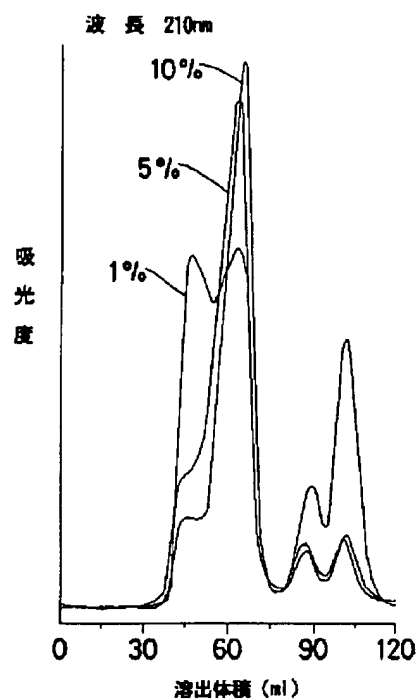
図 4

アクチナーゼによる加水分解で得られた水溶性粉末のゲル濾過



【図5】

図 5
 アクチナーゼの量の変化に対する水溶性粉末のゲル濾過



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵
 A 6 1 K 37/12

識別記号 庁内整理番号
 A D N 8314-4C

F I

技術表示箇所

(72)発明者 平林 潔
 東京都小平市小川東町1丁目16番21号

PAT-NO: JP406292595A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 06292595 A

TITLE: PRODUCTION OF LOW-MOLECULAR WEIGHT
FIBROIN

PUBN-DATE: October 21, 1994

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

HIRABAYASHI, KIYOSHI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

HIRABAYASHI KIYOSHI

MIYAGAWA YOSHITO

KUSUYAMA MITSUGI

KK MICRO SILK

COUNTRY

N/A

N/A

N/A

N/A

APPL-NO: JP05078343

APPL-DATE: April 5, 1993

INT-CL (IPC): C12P021/06, A23J003/04 , A23J003/34 ,
C07K015/08 , A61K007/00
 , A61K037/12

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain a low-molecular weight fibroin
containing a useful
peptide having increased functionality by hydrolyzing a
high-molecular weight
fibroin obtained from silk yarn.

CONSTITUTION: A low-molecular weight fibroin having an

average molecular
weight of 200-4,000 and high physiological activity can be
produced by
hydrolyzing a high-molecular weight fibroin obtain from
silk yarn using a
hydrolase which has not been used hitherto.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

DERWENT-ACC-NO: 1995-009083

DERWENT-WEEK: 199502

COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Low mol fibroin prepn. - by
dissolving high mol. fibrin
in neutral salt contg. aq. soln.

PATENT-ASSIGNEE: HIRABAYASHI K[HIRAI] , KUSUYAMA
S[KUSUI] , MICROSILK
KK[MICRN] , MIYAKAWA Y[MIYAI]

PRIORITY-DATA: 1993JP-0078343 (April 5, 1993)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	PUB-DATE	
LANGUAGE		MAIN-IPC	
<u>JP 06292595 A</u>		October 21, 1994	N/A
010	C12P 021/06		

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP 06292595A	N/A	1993JP-
0078343	April 5, 1993	

INT-CL (IPC): A23J003/04, A23J003/34 , A61K007/00 ,
A61K037/12 ,
C07K015/08 , C12P021/06

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 06292595A

BASIC-ABSTRACT:

Low mol. fibroin is prepd. by dissolving high mol. fibroin
in neutral salt
contg. aq. soln. in the presence of proteolytic enzyme, to
produce polypeptide
of average mol. wt. of 200-4000.

The proteolytic enzyme is pref. at least one enzyme selected from actinase, elastase, chymotrypsin, thermoase, pancreatin, pepsin, trypsin, lenine, cathepsin and rhoctase.

USE/ADVANTAGE - More functional and low mol. fibroin may be obtd. by using elastase and actinase to hydrolyse high mol. fibroin obtd. from silk yarn.

In an example, to 1500 pts. wt. of effective fibroin of 2 wt. % fibroin soln.

1 pts. wt. of elastase was dissolved. 0.05M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) was charged to keep pH 8.8 at 37 deg.C to react for 12-48 hrs. After a period of fixed time, the fibroin soln. was boiled rapidly to inactivate the enzyme and centrifuged. After freezing for 5 days. It was lyophilised respectively. Low mol. fibrin was obtd. The longer the decomposing time the higher the yield of water sol. powder. The highest yield (yield: 98.7%) of water sol. powder was obtd. for 48 hours of reaction.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/5

TITLE-TERMS: LOW MOLECULAR FIBROIN PREPARATION DISSOLVE
HIGH MOLECULAR FIBRIN

NEUTRAL SALT CONTAIN AQUEOUS SOLUTION

DERWENT-CLASS: B04 D13 D16

CPI-CODES: B04-N04; D03-H01L; D03-H02A; D05-A02C;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M720 M903 N134 N422 N513 Q233 V600 V752

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1995-003239

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacture approach of the low-molecular-weight fibroin characterized by dissolving the amount fibroin of giant molecules in the water solution containing neutral salt, making a proteolytic enzyme live together, and a mean molecular weight making the polypeptide of 200-4000 generate.

[Claim 2] The manufacture approach of a low-molecular-weight fibroin according to claim 1 that said proteolytic enzyme is characterized by being AKUCHINAZE, elastase, a chymotrypsin, SAMOAZE, a van creatine, a pepsin, a trypsin, renin, a cathepsin, and at least one kind of enzyme with which it is chosen out of good TAZE.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing pH variation of hydrolysis by the elastase which applies this invention.

[Drawing 2] It is drawing showing the infrared absorption spectrum of the low-molecular-weight fibroin obtained by hydrolysis by the elastase which applies this invention.

[Drawing 3] It is drawing showing the gel filtration of the water-soluble powder obtained by hydrolysis by the elastase which applies this invention.

[Drawing 4] It is drawing showing the gel filtration of the water-soluble powder obtained by hydrolysis by AKUCHINAZE which applies this invention.

[Drawing 5] It is drawing showing the gel filtration of water-soluble powder to change of the amount of AKUCHINAZE which applies this invention.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the manufacture approach of the low-molecular-weight fibroin which can be used for edible, the object for physic, medical supplies, and cosmetics.

[0002]

[Description of the Prior Art] A silk thread is the structure with which the sericin adhered around the fibroin of a fibrillation crystalline region, and a sericin is removed by secondary elaboration, such as refinement, and it is used for garments as a silk fibre. The outstanding property is used also in applications other than this. It is made to various configurations, such as film, powder, gel, and a water solution, and the application used for edible, the object for physic, medical supplies, and cosmetics attracts attention.

[0003] Since a fibroin consists of a native protein containing dozens of kinds of amino acid, it can be used for fields various in this way. The serine which occupies the glycine which occupies 45% of configuration amino acid, and 12% has the operation which controls blood cholesterol level concentration, and the alanine of the 2nd place promotes alcohol metabolism, and it is supposed that there is a preventive effect of Alzheimer's disease in a thyrosin. Moreover, it is said that secretion of an insulin is promoted. There are a silk drink of the playback fibroin solution obtained by dissolving and dialyzing a silk thread in a high-concentration calcium chloride solution, jelly which gelled this, paper food made into the shape of a film in such functional food. The food of such a fibroin is indicated by JP,1-256350,A.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The fibroin currently indicated by this official report dissolves and refines the fibroin contained in a silk thread, molecular weight is 300,000 or more protein, and the digestion of it is hard to be carried out in the body in the condition as it is. For this reason, it is desirable to carry out depolymerize by cutting off the chain of a fibroin. Moreover, since the solubility to water increases by carrying out depolymerize, the use range may spread.

[0005] Then, an artificer tried to attempt to cut off and carry out depolymerize of the chain of a fibroin by hydrolysis by the hydrochloric acid. However, since the hydrolysis by the hydrochloric acid turned off the chain at random, control of the molecular weight of hydrolyzate was difficult. The obtained low-molecular-weight fibroin also contained considerably that by which molecular weight was decomposed even into 150 or less amino acid level. What used this low-molecular-weight fibroin as powder was that in which is coloring it yellow and there is a nasty smell and the peculiar taste. When it was going to make water remelt this low-molecular-weight fibroin powder, remarkable non-dissolved residue remained. In order to remove such an impurity, it was tried to attempt to process with activated carbon. Although were obtained and it was powerful, yield became 50% or less and a bad thing.

[0006] That the low-molecular-weight fibroin manufactured by the conventional approach as described above cannot become what has proper molecular weight easily, including an impurity mostly, if the process for removing an impurity is added, a production process not only becomes complicated, but

yield will become bad. This invention eliminates such a fault and it aims at offering the manufacture approach for manufacturing the pure low-molecular-weight fibroin by which molecular weight was controlled moderately with sufficient yield.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order to attain said purpose, an artificer came to complete this invention paying attention to the ability of a proteolytic enzyme (protease) to cut the chain of a fibroin in a certain specific part.

[0008] That is, the manufacture approach of the low-molecular-weight fibroin of this invention dissolves the amount fibroin of giant molecules in the water solution containing neutral salt, protease is made to live together, and a mean molecular weight makes the polypeptide of 200-4000 generate.

[0009] A proteolytic enzyme can be used choosing it from AKUCHINAZE, elastase, a chymotrypsin, SAMOAZE, a van creatine, a pepsin, a trypsin, renin, a cathepsin, and good TAZE. AKUCHINAZE and elastase have a desirable mean molecular weight to making the polypeptide of 200-4000 generate especially. The number of peptides is suitable for 3 to about five, average molecular weight is suitable for edible [of 200 to about 500, and a man], and the low-molecular-weight fibroin obtained especially using AKUCHINAZE is excellent also in bioactive.

[0010] The neutral salt contained in the water solution for dissolving the amount fibroin of giant molecules is a calcium chloride or a lithium bromide. Moreover, the water solution containing this neutral salt may be made to mix ethanol.

[0011]

[Function] In order to hydrolyze the amount fibroin of giant molecules with protease, a value with moderate molecular weight and a polypeptide with the sufficient purity in which it was controlled by 200-4000 generate with sufficient yield.

[0012]

[Example] In order to obtain the powder of a low-molecular-weight fibroin from a silk thread, it passes through the process as follows. A sericin is removed by it being immersed in 0.5% solution of a sodium carbonate, and heating and stirring a silk thread raw material, for example, a refuse cocoon, first, and the fiber of a fibroin is obtained. It will dissolve, if the fiber of this fibroin is put in and boiled in hydrochloric-acid calcium which is the water solution of neutral salt. Dialysis of this solution obtains a fibroin solution. About one amount of hydrolase, for example, elastase, is added to this fibroin solution to 1500 amounts of a fibroin. Temperature is kept at about 37 degrees C. The buffer solution is put in in order to maintain pH suitable for the activity of hydrolase. the case where hydrolase is elastase -- proper pH -- 8.8 it is -- 0.05M tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane] can be used as the buffer solution.

[0013] After enzymatic hydrolysis is boiled promptly, carries out deactivation of the enzyme, and divides reaction mixture into supernatant liquor and precipitate according to centrifugal separation. After freezing a supernatant and precipitate for about about five days, respectively, it dries with a freeze dryer and a low-molecular-weight fibroin is obtained as a powder sample. Yield is calculable by the following formula from the powder weight P obtained from the powder weight S obtained from supernatant liquor, and precipitate.

$\{S/(S+P)\} \times 100 = \text{yield (\%)}$

Electrophoresis, an infrared absorption spectrum, thermogravimetric analysis (TGA), electron microscope photograph photography, gel filtration, and amino acid analysis can investigate the property of the obtained low-molecular-weight fibroin. The characterization of the example of an experiment which manufactured the low-molecular-weight fibroin by the approach of applying this invention hereafter, and the low-molecular-weight fibroin manufactured in the example of an experiment is indicated.

[0014] Asahi Tokai which is a domestic silkworm from a Tokyo University of Agriculture and Technology attached Tsukui farm was used for the cocoon which is the raw material of the production silk thread of a fibroin solution. The 0.5-% of the weight sodium-carbonate water solution of the amount of 50 times which boiled this domestic silkworm cocoon refined twice for 30 minutes, and the sericin was removed. The obtained fibroin was dried after rinsing. The refined fibroin was boiled in 40 - 50%

calcium chloride water solution of the amount of 20 times, and it dissolved. This was enough cooled at the room temperature, and after putting into the cellulose tube underwater and dialyzing for three days, it condensed by the air dried. The concentration of a fibroin solution was measured by the dry weight method. The obtained fibroin solution was adjusted to concentration 2% of the weight, and hydrolysis was presented.

[0015] Example 1: To effective fibroin 1500 weight of the 2 % of the weight fibroin solution of hydrolysis by elastase, elastase was dissolved at a rate of 1 weight, buffer-solution 0.05M tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane] was put in, pH was kept at 8.8, temperature was kept at 37 degrees C, and predetermined carried out the time amount (12 - 48 hours) reaction. After predetermined time amount, the fibroin solution was boiled promptly, deactivation of the enzyme was carried out, and reaction mixture was divided into supernatant liquor and precipitate according to centrifugal separation. Freeze dryer after freezing supernatant liquor and precipitate for about about five days, respectively (Tokyo Rikakikai make FREEZEDRYER FDU-830) It dried and the low-molecular-weight-ized fibroin was obtained. The powder which was able to obtain the powder obtained from supernatant liquor from water-soluble powder and precipitate was used as precipitate, and it considered as the characterization sample.

[0016] in order to check about the optimal enzyme concentration -- aforementioned amount of elastases: -- effective -- everything but amount = of fibroins 1:1500 -- amount of elastases: -- effective -- amount = of fibroins 1:3000, and amount of elastases: -- effective -- it hydrolyzed also about the enzyme concentration of amount = of fibroins 1:6000, and whenever [founding / of a solution] was measured. Consequently, as for whenever [founding], what has many amounts of enzymes was more high. that is, amount of elastases: -- effective -- amount = of fibroins 1:1500 are the optimal enzyme concentration.

[0017] Also in order to check this, the electrophoresis trial was performed about three kinds of above-mentioned sample solutions. 10micro of fibroin solutions l which adjusted solution concentration so that it might become [ml] in 5mg /was made into the concentration gradient SDS polyacrylamide gel of homogeneity with ** 15%. It migrated by 20mA low current for about 2 hours using the buffer solution for migration. Gel was dipped in decolorization liquid after migration termination for 12 hours for 2 hours at ****. electrophoresis -- amount of elastases: -- effective -- it turned out that amount =of fibroins 1:1500 are the highest as for whenever [decomposition].

[0018] In order to investigate the time shift of the hydrolysis reaction by elastase, hydrolysis time amount investigated the yield in 12 hours, 24 hours, and 48 hours. in addition, a sample -- enzyme concentration -- amount of elastases: -- effective -- it is a thing about amount =of fibroins 1:1500. The yield of the water-soluble powder of the low-molecular-weight fibroin by hydrolysis time amount is shown in Table 1.

[0019]

[Table 1]

表 1

分解時間	水溶性粉末の収率 (%)	非水溶性粉末の収率 (%)
1 2 時間	9 4 . 8	5 . 2
2 4 時間	9 6 . 6	3 . 4
4 8 時間	9 8 . 7	1 . 3

[0020] It turns out that the ratio of precipitate has decreased as hydrolysis progresses from this table 1. For obtaining water-soluble powder with the highest yield in predetermined time, 48 hours is desirable. Moreover, water-soluble powder occupied 90% or more and high yield also in which time amount.

[0021] Next, in order to know the terminal point of hydrolysis, pH variation measurement was

performed. When hydrolyzing by the alkali side, the amino group is hardly dissociated by this pH. Since only an isolation carboxyl group dissociates, it can use that pH of a solution falls gradually and the terminal point of hydrolysis can be known. In measurement, FIBURON solution concentration was adjusted to 2%, and the amount of enzymes was adjusted as follows.

(1) amount of elastases: -- effective -- amount of amount = of fibroins 1:1500 (2) elastases: -- effective -- amount of amount = of fibroins 1:3000 (3) elastases: -- effective -- amount of amount = of fibroins 1:4500 (4) elastases: -- effective -- by adding amount = of fibroins 1:6000 4N NaOH for every fixed time amount, by hydrolysis, fine-changed pH was returned to pH=8.8 before reacting, and subsequent pH fluctuation was measured using the glass-electrode type hydrogen-ion-concentration meter. The result is shown in drawing 1. It showed almost fixed fluctuation from drawing 1 in 2 hours - 6 hours after the behavior of pH variation did not change even if the amounts of enzymes differed, but it showed fluctuation of rapid pH. The graph is gone up and down after that. Repeating movement under besides, the amplitude becomes small and it is thought that it goes to a terminal point.

[0022] further -- enzyme concentration -- amount of elastases: -- effective -- electrophoresis was performed to the low-molecular-weight fibroin obtained by amount = of fibroins 1:1500, and whenever [in each time amount / hydrolysis] was investigated. The evaluation sample used the thing of 1 minute - hydrolysis time amount 48 hours. According to this, signs that decomposition progresses till hydrolysis time amount 12 hours were observable, but the difference of whenever [after 12 hour / decomposition] was not understood.

[0023] henceforth, an evaluation sample -- hydrolysis time amount 48 hours, and amount of elastases: -- effective -- the water-soluble powder and precipitate of a low-molecular-weight fibroin which were obtained in the amount of enzymes of amount = of fibroins 1:1500 are used.

[0024] First, infrared-absorption-spectrum analysis was performed. an infrared spectrophotometer -- the Shimadzu make -- IR-435 -- using -- KBR -- it measured by law. Setting the wavelength field to 400-4000cm⁻¹, the sample used the low-molecular-weight fibroin of 48 hours. This result was shown in drawing 2. As for water-soluble powder, absorption was looked at by 1648cm⁻¹, 1534cm⁻¹, and 1248cm⁻¹. This is the amide I of a random coil, Amide II, and Amide III. It is in agreement with absorption. Moreover, absorption was looked at by precipitate 1620cm⁻¹, 1530cm⁻¹, and 1230cm⁻¹. This is Amide I, Amide II, and Amide III. It is in agreement with beta structure.

[0025] Next, thermogravimetric analysis was performed. thermal-analysis equipment -- made in the Shimadzu work place -- the pyrolysis temperature of a sample was measured using DTA-30. The Measuring condition was made into the programming rate of 10 degrees C / min, and 30-600 degrees C of temperature requirements in air. The second decomposition temperature is temperature (about 290 degrees C) from which disassembly of silk begins, and a microcrystal is destroyed at this temperature. With water-soluble powder, that temperature was about 220 degrees C, and this temperature hardly changed, even if time amount passed. The 3rd decomposition temperature was shifted to the low temperature side as time amount passed.

[0026] Next, since the powder produced from the buffer solution was not removed when it freeze-dried, in order that this powder might exist in water-soluble powder and precipitate in what kind of condition or the surface state of water-soluble powder and precipitate might observe in what kind of thing, the electron microscope photograph was taken. Supernatant liquor, the powder obtained from precipitate, and 0.05M Only the tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane] buffer solution was freeze-dried, and the electron microscope photograph of the obtained powder was taken. The powder produced from the buffer solution in both water-soluble powder and precipitate was not found. Moreover, irregularity was looked at by precipitate, although the front face of water-soluble powder was smooth when both were compared.

[0027] Next, gel filtration was performed in order to investigate the molecular weight distribution of water-soluble powder in detail. The glass tube was filled up after making gel swell with distilled water using sephadex G-50. The low-molecular-weight fibroin was divided into the mobile phase using deaerated distilled water by the rate of flow 10 - 20 m-cm -2-h-1, and the absorbance of 210nm was measured with the spectrophotometer. The result is shown in drawing 3. This shows that the thing of

the amount of macromolecules hydrolyzes to the thing of low molecular weight with the passage of time.

[0028] Next, in order to see the effect of amino acid composition to water solubility and hydrophobicity, amino acid analysis was performed. After adding 6-N hydrochloric acid of an amount to water-soluble powder and precipitate 200 times and carrying out a reduced pressure mine tube to them, it heated at 110 degrees C for 24 hours. After heating termination, after thinning a sample with a rotary evaporator except for a hydrochloric acid with the 1000 times as many sodium-citrate buffer solution (pH=2.2) as this, automatic amino-acid-analysis equipment investigated amino acid composition. Consequently, a difference was not looked at by amino acid composition among both.

[0029] Example 2: To effective fibroin 10 weight of the 2 % of the weight fibroin solution of hydrolysis by AKUCHINAZE, AKUCHINAZE was dissolved at a rate of 1 weight, buffer-solution 0.05M tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane] was put in, pH was kept at 7.0, temperature was kept at 37 degrees C, and the predetermined time (1 - 24 hours) reaction was carried out. After predetermined time, the fibroin solution was boiled promptly, deactivation of the enzyme was carried out, and reaction mixture was divided into supernatant liquor and precipitate according to centrifugal separation. After freezing supernatant liquor and precipitate for about about five days, respectively, it dried with the freeze dryer (Tokyo Rikakikai make FREEZE DRYERFDU-830), and the low-molecular-weight-ized fibroin was obtained. The powder which was able to obtain the powder obtained from supernatant liquor from water-soluble powder and precipitate was used as precipitate, and it considered as the characterization sample.

[0030] in order to check about the optimal enzyme concentration -- aforementioned amount of AKUCHINAZE: -- effective -- amount =of fibroins 1:10, and amount of AKUCHINAZE: -- effective -- amount =of fibroins 1:20, and amount of AKUCHINAZE: -- effective -- it hydrolyzed also about the enzyme concentration of amount =of fibroins 1:100, and whenever [founding / of a solution] was measured. Consequently, as for whenever [founding], what has many amounts of enzymes was more high. that is, amount of AKUCHINAZE: -- effective -- amount =of fibroins 1:10 are the optimal enzyme concentration.

[0031] henceforth -- evaluation of the low-molecular-weight fibroin produced in hydrolysis by AKUCHINAZE -- amount of AKUCHINAZE: -- effective -- the sample obtained by amount =of fibroins 1:10 was used.

[0032] In order to investigate the time shift of the hydrolysis reaction by AKUCHINAZE, hydrolysis time amount investigated the yield in 1 hour, 4 hours, 8 hours, 12 hours, and 24 hours. The yield of the water-soluble powder of the low-molecular-weight fibroin obtained by hydrolysis time amount is shown in Table 2.

[0033]

[Table 2]

表 2

分解時間	水溶性粉末の収率 (%)	非水溶性粉末の収率 (%)
1 時間	96.0	4.0
4 時間	93.6	6.4
8 時間	92.0	8.0
12 時間	90.4	9.6
24 時間	90.3	9.7

[0034] As shown in Table 2, in all the resolving times, the yield of water-soluble powder shows the high value of 90% or more.

[0035] The water-soluble powder of these resolving-time 12 hours performed gel filtration. Gel here used sephadex G-15. Other conditions are the same as hydrolysis by elastase. The result of gel filtration was shown in drawing 4. The peak of the amount of giant molecules and low molecular weight has come out with some broadcloth from drawing 4 in 1 hour. It became sharp also with the peak of the amount of macromolecules, and low molecular weight, and shifted to the low-molecular-weight side as time amount passed. The molecular weight of this fibroin was [the thing by the side of about 550 and low molecular weight of the thing by the side of the amount of macromolecules] about 220. This fibroin is the included low-grade polymer 3-5 about peptide linkage. Digestion will become difficult, if a fibroin has too much peptide linkage and molecular weight becomes large too much. Moreover, it will become the functionally inferior fibroin in case of a with a molecular weight of 150 or less from which there is too little peptide linkage and it is obtained by hydrochloric-acid hydrolysis thing. Therefore, the fibroin of the molecular weight 220-550 obtained here is a low-molecular-weight fibroin which was most excellent functionally.

[0036] Amino acid analysis of the low-molecular-weight fibroin obtained by hydrolysis by AKUCHINAZE was performed. In addition, analytic conditions are the same as that of the case of hydrolysis by elastase.

[0037] The analysis result of the water-soluble powder obtained after performing hydrolysis by AKUCHINAZE for 1 hour is shown in Table 3.

[0038]

[Table 3]

表 3

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 ($\text{mol}\%$)	含有量 (μg)	含有比率 ($\text{wt}\%$)
ASP	1. 565	1. 95	0. 208	2. 72
THR	0. 787	0. 98	0. 094	1. 22
SER	8. 080	10. 06	0. 849	11. 07
GLU	1. 549	1. 93	0. 228	2. 97
GLY	32. 511	40. 47	2. 441	31. 82
ALA	25. 769	32. 08	2. 296	29. 93
CYS	0. 000	0. 00	0. 000	0. 00
VAL	2. 128	2. 65	0. 249	3. 25
MET	0. 575	0. 72	0. 086	1. 12
ILE	0. 898	1. 12	0. 118	1. 54
LEU	0. 712	0. 89	0. 093	1. 22
TYR	3. 764	4. 69	0. 682	8. 89
PHE	0. 853	1. 08	0. 141	1. 84
HIS	0. 335	0. 42	0. 049	0. 64
LYS	0. 260	0. 32	0. 040	0. 53
ARG	0. 549	0. 68	0. 096	1. 25

[0039] The analysis result of the precipitate obtained after performing hydrolysis by AKUCHINAZE for 1 hour is shown in Table 4.

[0040]

[Table 4]

表 4

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 ($\text{mol}\%$)	含有量 (μg)	含有比率 ($\text{wt}\%$)
ASP	0.522	0.58	0.070	0.86
THR	0.317	0.35	0.038	0.47
SER	13.889	15.37	1.460	18.15
GLU	0.000	0.00	0.000	0.00
GLY	40.244	44.52	3.021	37.57
ALA	30.778	34.05	2.742	34.10
CYS	0.000	0.00	0.000	0.00
VAL	0.674	0.75	0.079	0.98
MET	0.641	0.71	0.096	1.19
ILE	0.489	0.54	0.064	0.80
LEU	0.503	0.56	0.066	0.82
TYR	1.174	1.30	0.213	2.64
PHE	0.279	0.31	0.046	0.57
HIS	0.063	0.07	0.009	0.12
LYS	0.140	0.16	0.022	0.27
ARG	0.673	0.74	0.117	1.46

[0041] The analysis result of the water-soluble powder obtained after performing hydrolysis by AKUCHINAZE for 12 hours is shown in Table 5.

[0042]

[Table 5]

表 5

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 ($\text{mol}\%$)	含有量 (μg)	含有比率 ($\text{wt}\%$)
ASP	1.559	1.92	0.208	2.76
THR	0.815	1.00	0.097	1.29
SER	9.131	11.24	0.960	12.75
GLU	1.457	1.79	0.214	2.85
GLY	33.580	41.33	2.521	33.49
ALA	27.187	33.46	2.422	32.18
CYS	0.000	0.00	0.000	0.00
VAL	2.078	2.56	0.243	3.23
MET	0.450	0.55	0.067	0.89
ILE	0.895	1.10	0.117	1.56
LEU	0.601	0.74	0.079	1.05
TYR	1.122	1.38	0.203	2.70
PHE	0.663	0.82	0.110	1.46
HIS	0.142	0.17	0.021	0.28
LYS	0.416	0.51	0.065	0.86
ARG	1.151	1.42	0.200	2.66

[0043] The analysis result of the precipitate obtained after performing hydrolysis by AKUCHINAZE for 12 hours is shown in Table 6.

[0044]

[Table 6]

表 6

アミノ酸 略記号	含有量 (μmol)	含有比率 (mol%)	含有量 (μg)	含有比率 (wt%)
ASP	0. 201	0. 28	0. 027	0. 28
THR	0. 114	0. 16	0. 014	0. 14
SER	4. 079	5. 78	0. 429	4. 51
GLU	0. 051	0. 07	0. 008	0. 08
GLY	12. 084	17. 13	0. 907	9. 55
ALA	16. 894	23. 95	1. 505	15. 84
CYS	0. 000	0. 00	0. 000	0. 00
VAL	0. 208	0. 30	0. 024	0. 26
MET	0. 655	0. 93	0. 098	1. 03
ILE	0. 389	0. 55	0. 051	0. 54
LEU	0. 276	0. 39	0. 036	0. 38
TYR	32. 843	46. 56	5. 951	62. 65
PHE	1. 134	1. 61	0. 187	1. 97
HIS	0. 376	0. 53	0. 055	0. 58
LYS	0. 338	0. 48	0. 052	0. 55
ARG	0. 893	1. 27	0. 156	1. 64

[0045] So big the difference was not looked at by the amino acid composition of the water-soluble powder of a hydrolysis time amount 1 hour, and precipitate so that it might see in Table 3 and Table 4. But if the presentation of the water-soluble powder of hydrolysis time amount 12 hours and sediment is compared so that it may see in Table 5 and Table 6, the tyrosin which is hydrophobic amino acid is contained also about 50-mol% in the way of sediment, and the rate of the serine which is a hydrophilic amino acid is falling. That is, although hydrolysis is progressing, the weight of precipitate increases. Sediment has many glycines which are the amino acid which constitutes the crystalline region of silk from a hydrolysis initial stage, alanines, and serines, this exists, and many the tyrosin which is the amino acid which constitutes the amorphous field, isoleucines, leucines, and phenylalanines into a water-soluble part are contained. Although the part in which the hydrolysis to ***** and the peptide of the amount of giant molecules which had melted into water till then also started to the terminal point, and hydrolysis contained the tyrosin at it precipitates, the peptide which contained the glycine, the alanine, and the serine conversely is imagined to be what becomes water solubility by hydrolysis.

[0046] Next, in order to consider the effect by the autolysis of an enzyme, own amino acid analysis of AKUCHINAZE was performed. According to this, most aspartic acids were contained in AKUCHINAZE. However, the content ratio (mol%) of the aspartic acid in a low-molecular-weight fibroin is very low. I thought that the effect of the amount of enzymes could be disregarded from this.

[0047] Next, in order to see the effect to enzyme concentration, it hydrolyzed by having changed the addition of an enzyme and whenever [founding / of each fibroin solution] was measured. The amount of enzymes was performed by three kinds, 1 % of the weight, 5 % of the weight, and 10 % of the weight. Consequently, whenever [founding / of a solution / 10% of the weight of] became [enzyme concentration] the highest.

[0048] Furthermore, the low-molecular-weight fibroin was obtained from three kinds of same fibroin solutions as the above, and gel filtration of water-soluble powder was performed. The result is shown in drawing 5. At the 1 % of the weight of the amounts of enzymes, the peak of the amount of giant molecules and low molecular weight became with some broadcloth. If 5 % of the weight is compared with 10 % of the weight, the way of 10 % of the weight will shift to a low-molecular-weight side more, and the peak will also change keenly. The optimal enzyme concentration could be 10 % of the weight from these things.

[0049] Example 3: The water solubility of a low-molecular-weight fibroin was evaluated at the water-soluble evaluation last. The sample which freeze-dried the fibroin solution as it was 2%, and was obtained, and elastase and the low-molecular-weight fibroin obtained from hydrolysis of AKUCHINAZE were added to 2ml of water, and was performed. Concentration to water was carried out at 0.5%, 1%, 2%, 5%, and 10%. The result is shown in Table 7.

[0050]

[Table 7]

表 7

	0.5 %	1 %	2 %	5 %	10 %
エラスターゼによる加水分解で得られた低分子量フィブロイン (48 時間)	○	○	○	△	×
アクチナーゼによる加水分解で得られた低分子量フィブロイン (12 時間)	○	○	○	○	△

○ : 可溶 ○ : やや可溶 △ : 難溶 × : 不溶

[0051] Although 2% can dissolve the low-molecular-weight fibroin obtained by hydrolysis by elastase, if it becomes the concentration beyond it, it will be hard coming to dissolve. 5% was able to dissolve the low-molecular-weight fibroin by AKUCHINAZE hydrolysis. It is thought that this difference is based on the difference in the magnitude of molecular weight.

[0052]

[Effect of the Invention] As mentioned above, as explained to the detail, by using elastase and AKUCHINAZE for hydrolase in hydrolysis of the amount fibroin of giant molecules obtained from a silk thread, it is more highly efficient than the fibroin obtained by the hydrochloric-acid hydrolysis known conventionally, and the low-molecular-weight fibroin which shows molecular weight 200-4000 can be obtained.

[Translation done.]